



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

**This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.**

출 원 번 호 : 특허출원 2003년 제 0078503 호
Application Number 10-2003-0078503

출 원 년 월 일 : 2003년 11월 07일
Date of Application NOV 07, 2003

출 원 인 : 주식회사 엔바이오테크놀로지
Applicant(s) EN-BIO TECHNOLOGY CO.,LTD.

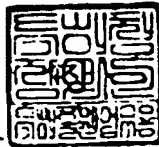
**CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT**

BEST AVAILABLE COPY

2004 년 11 월 15 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

4류명] 특허출원서
 5리구분] 특허
 6신처] 특허청장
 7출일자] 2003.11.07
 8명의 명칭] 신경세포 보호 활성이 있는 포도씨 추출물을 포함하는
 뇌질환 예방 및 치료용 조성물
 9명의 영문명칭] COMPOSITION COMPRISING GRAPE SEED EXTRACT HAVING
 NEURONAL CELL-PROTECTING ACTIVITY FOR PREVENTING AND
 TREATING BRAIN DISEASE
 1출원인]
 2명칭] 주식회사 엔바이오테크놀러지
 3출원인코드] 1-2000-015825-7
 4리인]
 5성명] 신동인
 6대리인코드] 9-2000-000156-1
 7포괄위임등록번호] 2002-082819-1
 8명자]
 9성명] 문원국
 1출원인코드] 4-2002-042164-9
 2명자]
 3성명] 김동우
 4출원인코드] 4-1998-603002-3
 5명자]
 6성명] 원무호
 7출원인코드] 4-2000-033974-1
 8명자]
 9성명의 국문표기] 황인구
 1성명의 영문표기] HWANG, In-Koo
 2주민등록번호] 760313-1024818
 3우편번호] 130-022
 4주소] 서울특별시 동대문구 전농2동 103-69
 5국적] KR
 6사참구] 청구

4지]	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규		
-	정에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인		
	신동인 (인)		
수료]			
【기본출원료】	20 면	29,000 원	
【가산출원료】	7 면	7,000 원	
【우선권 주장료】	0 건	0 원	
【심사청구료】	6 항	301,000 원	
【합계】	337,000 원		
【감면사유】	중소기업		
【감면후 수수료】	168,500 원		
부서류]	1. 요약서·명세서(도면)_1종 2. 중소기업기본법시행령 제2		
	조에의한 중소기업에 해당함을 증명하는 서류_1종		

【요약서】

요약

본 발명은 뇌허혈에 의해 유도되는 신경세포손상 보호용 포도씨 추출물 및 이 포함하는 뇌질환의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 포도씨 추출물은 뇌허혈에 의한 신경세포 손상을 저해하는 효과가 월할 뿐만 아니라 인체에 무해하여, 신경세포의 사멸에 의해 발생하는 뇌질환을 예 및 치료하기 위한 의약품 및 건강기능식품으로 사용할 수 있다.

표도
도 5

인어

뇌환, 신경세포사, 뇌허혈억제물질, 포도씨

【명세서】

발명의 명칭]

신경세포 보호 활성이 있는 포도씨 추출물을 포함하는 뇌질환 예방 및 치료용 조성물
[COMPOSITION COMPRISING GRAPE SEED EXTRACT HAVING NEURONAL CELL-PROTECTING
ACTIVITY FOR PREVENTING AND TREATING BRAIN DISEASE]

2면의 간단한 설명]

도 1은 포도씨 추출물을 PC12 세포주에 투여한 다음, 지산소환경시 신경세포사
지효과를 락테이트 디하이드로게나제 (LDH) 측정 실험으로 확인한 것이다.

도 2는 뇌허혈-재관류 유발 4일 후에 정상군 (A, C) 과 용매만을 투여한 대조군
, D) 실험동물의 뇌조직 중 해마부분을 염색한 사진으로, C와 D는 A와 B의 CA1 영
역을 400배로 확대 촬영한 사진이다.

도 3은 포도씨 추출물을 허혈-재관류 실시 30분전 (A 및 C) 또는 실시 30분후 (B
D)에 실험동물에 투여하고 4일 후 실험동물의 해마조직을 염색한 사진이다.

도 4는 도 3에서 관찰한 해마조직 중 CA1 영역만을 400배로 확대한 관찰한 사진
이다.

도 5는 포도씨 추출물을 허혈-재관류 실시 30분전 또는 실시 30분 후에 실험동
물에 투여한 다음, 4일 후에 살아남은 세포를 계수하여, 정상군과 비교하여 나타낸
그래프이다.

[발명의 상세한 설명]

[발명의 목적]

[발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술]

본 발명은 신경세포 보호활성이 있는 포도씨 추출물을 포함하는 뇌질환 예방 및
치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 PC12 세포주 및 동물모델에서 뇌허혈
발생 후 유발되는 해마 뇌세포의 광범위한 손상을 예방하거나 개선하는 작용을
지는 포도씨 추출물 및 이의 뇌질환 치료 및 예방을 위한 용도에 관한 것이다.

통계청에서 2003년 10월 발표한 우리나라 노령 인구의 비율을 살펴보면, 우리나라
는 지난 2000년 65세 이상 인구가 총인구에서 차지하는 비중이 7.2%에 이르러 고령
사회에 들어섰으며, 오는 2019년에는 이 비율이 14%를 넘어 고령사회에 진입할 것
으로 전망되고 있다. 이와 같이 최근 고령화 문제가 사회적인 이슈로 대두됨에 따라
노령인구의 특성이나 주거, 보건, 문화, 여가 등 노인복지 등에 대한 국민의 관심이
아지고, 이에 대한 통계 수요도 늘어나고 있다. 이러한 변화의 핵심은 노령화 인구
증가로 인해서 지난 50여 년간 사망의 주된 원인이 되었던 급성전염성질환보다는
성퇴행성 질병이 더욱더 큰 문제로 대두되고 있는 실정이다. 특히 만성퇴행성 질병
에서 뇌혈관질환에 의한 사망은 단일질환에 의한 사망들 중에서 2위를 기록하고 있
 매우 중요한 질환이다. 뇌혈관질환은 크게 2가지 형태로 분류될 수 있다. 하나는
출혈 등에서 볼 수 있는 있는 출혈성 뇌질환이고, 다른 하나는 뇌혈관의 폐쇄 등에

해 나타나는 허혈성 뇌질환이다. 출혈성 뇌질환은 교통사고 등에서 의해서 주로 나타나며, 허혈성 뇌질환은 주로 노령의 사람들에게서 자주 나타나는 질환이다.

대뇌에 일시적인 뇌허혈이 유발되는 경우, 산소와 포도당의 공급이 차단되어 신경세포에서는 ATP 감소, 부종 (edema)이 발생되며, 결국 뇌의 광범위한 손상이 유발된다. 신경세포의 사멸은 뇌허혈이 있는 후 상당한 시간 경과 후에 나타나는데, 이를 지연성 신경세포사 (delayed neuronal death)라고 한다. 지연성 신경세포사는 몽골리저빌 (Mongolian gerbil)을 이용한 일과성 전뇌 허혈모델 (transient forebrain ischemic model)을 통한 실험에서 살펴보면, 5분간 뇌허혈 유도 4일 후 해마 (hippocampus)의 CA1 영역에서 신경세포사가 관찰되는 것으로 보고되고 있다 (Kirino T. *Brain Res.*, 239, 57-69, 1982) .

지금까지 가장 많은 사람들이 받아들이는 뇌허혈에 의한 신경세포사 기전으로는 glutamate가 축적되게 되며, 이러한 글루타메이트가 세포내로 유입되어 결국 과도한 세포내 칼슘의 축적으로 신경세포사가 유발된다는 흥분성 신경세포사 기전 (Kang et al., *J Neurocytol.*, 30, pp945-955, 2001) 과 허혈-재관류시에 갑작스러운 산소 공급으로 인해 생체내 라디칼의 증가로 인해 DNA 및 세포질에 손상을 입어 유발되는 산화성 신경세포사, 2가지 기전에 있다 (Won MH, et al., *Brain Res.*, 836, 70-78, 1999; Sun AY, Chen YM. *J. Biomed. Sci.*, 5, pp401-414, 1998; Flowers F, Swerman JJ. *New Horiz.*, 6, pp169-180, 1998) .

이러한 기전적인 연구를 바탕으로 해서 뇌허혈시에 나타나는 신경세포사를 효과적으로 억제하는 물질을 탐색하거나, 물질에 대한 기전을 밝히는 연구가 많이 수행되고 있다. 그러나 아직까지 효과적으로 뇌허혈에 의한 신경세포사를 억제하는 물질은 거의 없는 실정이다.

지금까지 유일하게 뇌허혈 치료제로 FDA 공인 시판 중인 조직플라스미노겐활성제(tissue plasminogen activator)는 혈전용해제로 뇌허혈을 유발시키는 혈전을 녹여 큰 산소 및 포도당의 공급을 유도하는 물질이다. 따라서 직접적으로 신경세포를 보호하는 것이 아니기 때문에 빠른 사용이 필요하며, 혈전용해제라는 특징 때문에 과량 사용이나, 자주 사용시에는 혈관벽이 얇아져 결국 출혈성 뇌혈관질환을 유발하게 된다.

또한 초기의 칼슘 유입을 효과적으로 억제하기 위한 칼슘채널 억제제(calcium channel blocker)인 MK-801의 경우 임상적 테스트가 실행이 되었으나 그 부작용으로 해 악플을 폐기한 바 있다.

한편 국내의 경우, 다수의 천연물질이 뇌졸중 예방에 효과가 있는 건강식품으로 판되고 있으나 이들 대부분은 과학적인 검증을 거치지 않은 것이 많으며 오히려 건강식품 남용의 원인이 되기도 하여 사회적인 문제가 되고 있다.

따라서 식품으로 식이가능한 천연자원들을 객관적인 검증하여 뇌질환 치료 및 방효과를 갖는 천연물질을 개발하고자 하는 노력이 시급히 요구된다.

포도씨(Grape Seed extract)는 해독, 살균 항암 효과들 지닌 카테킨 성분과 피의 탄력을 증진시키고 혈관을 강화시키는 피크나게들도 다량 함유되어 있는 것으로

고되어 있으며, 유해산소의 작용을 차단하는 항산화 효과도 있는 것으로 알려져 있다.

본 발명자들은 포도씨가 뇌허혈성 신경세포사를 현저히 억제시킬 수 있는 활성 성분을 확인하여, 이들 근간으로 본 발명을 완성하였다.

[발명이 이루고자 하는 기술적 과제]

본 발명은 인체에 무해하며 뇌허혈에 의한 신경세포 손상을 방지할 수 있는 천연 식물 추출물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

또한 본 발명은 신경세포보호활성을 갖는 포도씨 추출물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

또한 본 발명은 상기 포도씨 추출물을 유효성분으로 포함하는 뇌질환 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[발명의 구성 및 작용]

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 신경세포보호활성을 갖는 포도씨 추출물을 제공한다.

또한, 본 발명은 신경세포 보호활성을 갖는 포도씨 추출물을 유효성분으로 포함하는 뇌질환 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

상기 포도씨 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 저급알콜 또는 이들의 혼합용매에 용해된 것을 포함한다.

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명의 포도씨 추출물은,

(a) 건조하여 파쇄한 포도씨 무게 (kg)의 약 1 내지 20배의 부피, 바람직하게는 내지 12배의 물을 가한 후, 20 내지 50℃, 바람직하게는 상온에서, 약 1시간 내지 1, 바람직하게는 12시간 내지 1일 교반하면서, 수산화나트륨 또는 수산화칼륨과 같은 강염기를 가하여 pH를 8 내지 11, 바람직하게는 pH 10으로 조정하여 약 1시간 내 24시간 교반추출하는 제 1 단계;

(b) 상기 추출액에 염산과 같은 강산을 가하여 pH를 2 내지 4, 바람직하게는 pH 2로 조정한 후, 원심분리하여 침전물만을 회수하는 제 2 단계;

(c) 상기 침전물에 중량비 약 3 내지 7배, 바람직하게는 약 5배량의 에탄올, 메탄올 등과 같은 저급알코올을 가하여 현탁시키고, 원심분리한 상등액을 감압농축시키는 제 3 단계;

(d) 상기 농축액에 등량의 헥산과 같은 유기용매를 가하여 진탕한 후, 상등액인 산을 제거하고 남은 액을 정제, 증결건조하는 제 4 단계로 이루어진 제조 공정을 함하는 제조방법으로 수득된다.

따라서, 본 발명은 상기 제조방법으로부터 수득되는 신경세포 보호활성을 갖는 포도씨 추출물을 제공한다.

상기 물에 의한 포도씨 추출물 제조방법에서, 수산화나트륨 첨가 후 추출용액의 pH가 8.0 이하일 경우, 효소저해제의 추출효율이 현저하게 감소되므로 추출용매의 pH 8.0 이상으로 조정하여 추출하는 것을 특징으로 한다.

또한, 본 발명의 포도씨 에탄올 추출물은 건조하여 파쇄한 포도씨 무게 (kg)의 8 내지 20배의 탄소수 1 내지 4의 저급알칸 또는 환과 이급의 혼합용매, 바람직하게는 50 내지 100% 에탄올을 가하여 상온 내지 100℃에서 약 1시간 내지 24시간동안, 1 내지 5회 침지, 교반추출, 열수추출 또는 환류냉각추출하고, 감압농축 또는 건조시켜 수득할 수 있다.

부가적으로 상기 물 가용 추출물 또는 저급 알코올 가용 추출물을 묽은 현탁한, 이들 현탁액의 약 1 내지 10배, 바람직하게는 약 1 내지 5배 부피의 에틸아세테트와 같은 저급 아세테이트, 클로로포름, 아세톤, 디클로로메탄, 사염화탄소 등과 같은 비극성 용매를 가하여 1회 내지 5회, 바람직하게는 2회 내지 4회 분획하여 비극 용매가용층 및 수가용층을 수득할 수 있다. 또한 추가로 통상의 분획 공정을 수행 수도 있다 (Harborne J.B.: *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis*, 3rd Ed., p 6-7, 1998).

본 발명의 바람직한 실시예에서는 에탄올로 추출, 농축한 뒤 상기 농축액에 등의 헥산을 가하여 진탕한 후, 상등액인 헥산층을 제거하고 남은 액을 동결건조하여 갈색의 분말을 얻는다.

상기 포도씨 추출물은 포도 (*Vitis vinifera* L.), 유럽산 포도 (*Vitis vinifera*), 국산 포도 (*Vitis labrusca*), 강변 포도 (*Vitis riparia*), 사막 포도 (*Vitis pectus*), 겨울 포도 (*Vitis berlandieri*), 머두 (*Vitis coignetiae* Pulliat ex anchon), 왕머두 (*Vitis amurensis* Ruprecht), 까마귀머두 (*Vitis ficifolia* Bunge), 머두 (*Vitis flexuosa* Thunb.) 등의 포도씨로부터 추출된 추출물을 포함한다.

본 발명의 상기와 같이 얻어진 포도씨 추출물은 PC12 세포주에서의 락테이트 디드모게나아제 (LDH)를 감소시키고, 저밀도 이용한 등온실험에서도 포도씨 추출물을 구두여시 CA1영역의 신경세포를 보호하여, 뇌허혈에 의한 신경세포 손상을 현저히 방할 수 있음을 확인하였다.

이에, 본 발명은 상기 제조방법으로 수득된 신경세포보호활성을 갖는 포도씨 추출물을 제공하며, 이는 신경세포사에 의하여 유발되는 뇌질환을 예방하고 치료하는 데로 사용할 수 있다.

이에, 본 발명은 신경세포보호활성을 갖는 포도씨 추출물을 유효성분으로 포함하는 뇌질환 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

상기 신경세포사에 의하여 유발되는 뇌질환으로는 뇌졸중, 중풍, 파킨슨병, 헌턴병, 피크 (Pick)병 및 크로이츠펠트-야콥 (Creutzfeldt-Jakob)병이 있다.

상기 본 발명의 포도씨 추출물을 함유하는 뇌질환 예방 및 치료용 약조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 추출물을 0.001 내지 50 중량%로 포함한다. 포도씨 추출물의 함량이 0.001 중량% 미만인 경우 효과적인 효능을 위해선 다의 투여가 필요할 수 있으며, 50 중량% 초과하는 경우 사용량에 비해 효능이 일정 수 있어 비경제적일 수 있다. 그러나 가장 바람직하기로는 뇌질환 예방 및 치료 조성물의 사용방법 및 사용목적에 따라 포도씨 추출물의 함량을 적절히 조절하는 이 좋다.

본 발명의 포도씨 추출물을 포함하는 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

본 발명의 추출물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 폴리옥시도론, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 팜산유를 들 수 있다.

본 발명에 따른 추출물을 포함하는 조성물은, 각각 동상의 방법에 따라 산제, 입제, 경제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

뇌질환 예방 및 치료용 조성물은 약제 또는 식품으로 사용할 수 있으며, 약제로 용하는 경우 투여방법은 경구 또는 비경구 모두 가능하다. 상기 조성물의 제형은 용방법에 따라 달라질 수 있으나, 경고제 (PLASTERS), 과립제 (GRANULES), 로션제 (LOTIONS), 산제 (POWDERS), 시럽제 (SYRUPS), 액제 (LIQUIDS AND SOLUTIONS), 에어로졸 (AEROSOLS), 연고제 (OINTMENTS), 유동엑스제 (FLUIDEXTRACTS), 유제 (EMULSIONS), 현탁제 (SUSPENSIONS), 침제 (INFUSIONS), 경제 (TABLETS), 주사제 (INJECTIONS), 캡슐제 (CAPSULES) 및 환제 (PILLS) 등으로 제조할 수 있다.

또한 뇌질환 예방 및 치료용 조성물의 투여량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체내서 활성 성분의 흡수도, 분활성을 및 병용되는 약물을 고려하여 결정하는 것이 좋으며, 1일 포도씨 추출물을 기준으로 하였을 때 50 mg/kg (체중) 내지 500 mg/kg (체중)으로 투여할 수 있다.

또한 본 발명의 포도씨 추출물은 기타 식품의 주, 부원료 및 식품첨가제로서 용이 가능하다.

또한 본 발명은 포도씨 추출물 및 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제 포함하는 뇌질환 예방 및 개선을 위한 건강기능식품을 제공한다.

본 발명의 추출물을 포함하는 조성물은 뇌질환의 예방 및 치료를 위한 약제, 식 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다. 본 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 물 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성식품류 등이 다.

본 발명의 추출물 자체는 독성 및 부작용은 거의 없으므로 예방 목적으로 장기 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

본 발명의 상기 추출물은 뇌질환의 예방 및 개선을 목적으로 식품 또는 음료에 가될 수 있다.

본 발명의 건강 음료 조성물은 필수 성분으로서 상기 추출물을 함유하는 외에는 제성분에는 특별한 제한점은 없으며, 통상의 음료와 같이 여러가지 향미제 또는 천연수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 노사카라이드, 예들 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예들 들어 말토스, 슈로스 등; 및 폴리사카라이드, 예들 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 미제로서 천연 향미제 (타우마틴, 스테비아 추출물 (예들 들어 레바우디오시드 A, 글시르히진등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 g당 일반적으로 약 1 내지 20 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.

상기 외에 본 발명의 조성물은 여러가지 영양제, 비타민, 펩톤 (전해질), 합성 미제 및 천연 증미제 등의 증미제, 착색제 및 증진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중 부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

본 발명의 뇌질환 예방 및 치료용 조성물은 신경세포사에 의한 뇌질환 치료 및 방을 위한 용도, 특히 뇌허혈에 의한 질환을 예방 및 치료하기 위한 용도로 사용할 있다.

이하 본 발명의 실시예 및 실험예를 기재한다. 하기 실시예 및 실험예는 본 발 을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니

시예 1. 포도씨 추출물의 제조

포도씨에 물을 가하여 pH를 조절해서 추출하는 본 발명에 의한 추출 방법에 의 여 추출물을 얻고, 또한 종래의 에탄올 추출방법에 의해 추출하여 추출물을 었다.

1. 포도씨 추출물 제조

건조하여 파쇄한 포도씨 1kg에 10배량의 물을 가한 후 교반시키면서 수산화나트륨(NaOH)을 가하여 pH를 10으로 조정한 후 6시간 상온에서 교반 추출하였다. 얻어진 출액에 염산(HCl)을 가하여 pH가 3이 되도록 조정한 후 원심분리하여 침전물 100g 회수하였다. 얻어진 침전물 100g에 중량비 5배량의 에탄올을 가하여 현탁시키고 심분리한 상등액을 감압 농축시킨 후 농축액 50g에 등량의 헥산을 가하여 상등액을 거하고 하층액을 등결 건조하여 갈색의 분말 30g을 수득하였다.

2. 포도씨 에탄올 추출물 제조

건조하여 파쇄한 포도씨 1kg에 10배량의 50% 내지 100% 에탄올을 가하고 상온에 교반시키면서 12시간 추출하여 여과한 후 1/10 부피로 감압농축시켰다. 농축액 8g에 등량의 헥산을 가하여 상등액을 제거하고 하층액을 등결 건조하여 갈색의 분말 0g을 수득하였다. 이렇게 완성된 추출물을 10 ml의 물에 녹인 것을 원액(100 mg 추출/ml 물)으로 하여 실험에 사용하였다.

첨예 1. 포도씨 추출물의 저산소환경에서 세포 보호효능 검증-락테이트 디하드로게나제 측정 (*in vitro*)

PC12 세포에 COCl₂을 투여하여 저산소환경을 통한 신경세포손상을 유도한 후, 경세포의 손상 유무를 확인하기 위해 배양세포에서 세포밖의 배양액으로 준비되는 테이트 디하이드로게나제(LDH) 농도를 측정하였다. 이는 손상 및 파괴된 세포로부터

거의 분비가 완료되는 20-24시간 정도에서 세포배양액을 채취하여 마이크로플레이트리더를 사용하여 측정하였다.

실시에 1에서 준비한 포도씨 추출물을 저산소환경 유도 전 또는 후에 PC12세포 0, 10, 50, 100, 500 및 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 각각 처리하고, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 20 내지 24시간 양한 다음 세포 배양액을 수득하였다. 배양액은 종생 바이오텍(Zhong Sheng otech) 표준시약을 가지고 Beckman DU-640 흡광광도계를 이용하여 효소역학적 nzyme dynamic) 방법으로 실시하여 락테이트 디하이드로게나제의 농도를 측정하였

그 결과는 도 1에 도시한 바와 같다. 도 1에서 저산소환경 유도전 및 유도 후 포도씨 추출물을 처리한 실험군은, 용매만을 처리한 대조군에 비하여 락테이트 디하이드로게나제의 분비율이 처리 농도에 따라 감소하였다. 따라서 포도씨 추출물은 산소환경에 의해서 유도되는 세포사를 현저하게 감소시킴을 확인할 수 있었으며, 농도에서도 세포 독성이 거의 없었다.

험에 2. 포도씨 추출물의 신경세포 보호효능 검증-동물실험 (ia vivo)

저빌을 이용한 동물실험으로 포도씨 추출물의 신경세포사 억제효과를 확인하였

실험동물의 사육 및 투여방법

실험동물로 체중 65-75 g의 수컷 및 암컷 몽골리안 저빌(Mongolian gerbil, riones unguiculatus) 60 마리를 사용하였다.

실험동물은 오전 7시부터 오후 7시까지 빛을 가하는 일정한 명암주기 하에서 온 23 ± 2 °C와 상대습도 55 ± 10 %로 사육하였다. 음식과 물은 자유로이 섭취하게 하였다.

실험

실험동물에 포도씨 추출물을 허혈유발 전 30분 또는 허혈유발 후 30분에 식도용 튜브를 이용하여 0.5 ml 경구투여 하였다. 대조군으로는 아무런 물질도 투여하지 않았다. 이후 실험동물은 질소와 산소가 7 : 3으로 혼합된 가스에 3 % 이소플루란 (isoflurane, Baxtor사, USA)으로 전신마취하였고, 동일한 가스에 2.5 % 이소플루란으로 마취를 유지하면서 수술을 수행하였다. 목 부위의 털을 깎고 소독한 다음 절개하여 양쪽 온몸동맥 (common carotid arteries)을 노출시키고, 동맥류 클립 (aneurysm clip, Staeltling, USA)을 이용하여 5 분 동안 결찰하여 허혈을 일으킨 후 클립을 제거하여 재관류시켰으며, 대조군은 용매만을 투여하여 동일한 수술을 시행하였으며, 이 때 각 실험군은 검안경 (ophthalmoscope)을 이용하여 망막중심동맥 (central artery of retina)의 혈액 순환 유무를 관찰하여 완전한 온몸동맥의 폐쇄를 인하였다. 허혈을 유발시키는 동안 직장 내 체온계를 삽입하여 체온을 측정하고, 실험동물의 온도에 따라 자등으로 조절되는 온열 패드를 사용하여 체온을 정상 체온 37 ± 0.3 °C로 일정하게 유지시켰다.

정상군, 대조군 및 각 실험군은 뇌허혈 유발 4일 후에 티오펜탈 소듐 (thiopental sodium, 유한양행, 한국)을 체중 kg 당 각각 40 mg의 용량으로 복강 내 투여하여 마취시킨 다음 1,000 ml 당 헤파린 1000 IU를 함유한 4 °C의 생리식염수를 심실로 주입하여 관류 세척하였다. 관류 세척이 끝난 동물은 바로 4 °C의 4 % 파

포름알데하이드 (in 0.1 M phosphate buffer: PB, pH 7.4)로 판류 고정을 하였다. 유 고정이 끝난 동물들 뼈절단기를 이용하여 머리뼈공간을 열어 뇌를 적출한 다음 일 고정액에서 4-6 시간 후고정하였다. 후고정이 끝난 뇌는 30 % 슈크로스 용액 (0.1 M phosphate buffer)에 넣어 바닥에 가라앉을 때까지 담구어 두었다. 이 후 라이드 마이크로톰 (sliding microtome, Reichert-Jung사, Germany)으로 조직을 30 두께로 잘라 보존액 (storing solution)이 들어있는 6 웰 플레이트에 넣어 사용시 지 4 ℃에서 보관하였다.

각 조직절편 중에서 해마복합체 (hippocampal formation)가 잘 나와 있는 조직을 선택하고, 조직에 묻어있는 보존액을 없애기 위해 0.01 M PBS로 10분씩 3회 세척한다. 이들 젤라틴 입힌 슬라이드 상에 두고 37 ℃에서 충분히 건조시켰다. 이후 류수에 잠시 담구어 둔 후 2 % 크레실 바이올렛 아세테이트 (cresyl violet etate, Sigma사, USA) 용액에 1분간 염색하였다. 조직은 흐르는 물에 충분히 세척하여 슬라이드에 묻어 있는 과량의 염료를 제거하고, 증류수에 잠시 담근 후 50 %, %, 80 %, 90 %, 95 % 및 100 % 용액을 거쳐 탈수 및 과량의 크레실 바이올렛을 세 하였다. 조직에서 니슬소체 (Nissle body)가 보이는 것을 확인한 다음 자일렌 unsei사, Japan)에 담구어 투명화한 다음, 캐나다 발삼 (Canada Balsam, Kento사, pan)으로 봉입하였다.

각 조직들은 디지털 카메라가 부착되어 있는 Axioplan microscope (Carl Zeiss , Germany)로 CA1 영역을 1000배로 사진촬영하였다. 보라색으로 염색된 부분을 이 지 분석기 (Optimas 6.5, USA) 프로그램을 사용하여 선택하고, 신경세포를 계수하였 . 각 군에 대한 유의성의 검증을 위하여 살아남은 신경세포의 수를 정상군의 신경

포수로 나누어 백분율로 표시하였으며, 통계적인 분석을 위해서 원-웨이 ANOVA 테스트 (One-way ANOVA test)를 수행하였다. 또한 각 군 중에서 가장 일반적인 부문을 따라 Axiophot microscope (Carl Zeiss, Germany)를 이용하여 사진 촬영을 하였다.

실험결과

각 실험군의 해마조직 염색사진은 도 2, 3 내지 4에 나타내었다.

도 2는 실험동물에 허혈-재관류를 실시하였을 때 정상군 (A 및 C)과 대조군 (B 및 의 해마조직 염색사진이며, C 및 D 각각은 A 및 B의 CA1영역을 400배로 확대 촬영 사진이다.

도 2에서 정상군은 CA1영역에서 신경세포가 관찰되는 반면에 대조군에서는 허혈 의해 세포가 죽어 염색된 신경세포가 관찰되지 않았다.

포도씨 추출물을 투여한 실험군에서의 결과를 살펴보면 도 3 및 4와 같다. 도 3에서 A 및 C는 포도씨 추출물을 뇌허혈 유발 30분전에 처리한 것이고, B 및 D는 뇌 허혈 유발 30분후에 포도씨 추출물을 처리한 것이며, A와 B는 수컷, C와 D는 암컷이다. 수컷과 암컷 모두에서 뇌허혈 유발 전 및 유발 후에 포도씨 추출물을 투여한 경 세포사 억제 효과가 관찰되어 CA1영역의 세포가 진하게 염색되는 것을 관찰할 수 있었다. 도 3의 사진은 모두 25배로 촬영한 것으로, 도 3의 CA1 영역만을 400배로 대하여 관찰하여 도 4로 나타내었다. 도 4에서 뇌허혈 유발 전과 유발 후 포도씨 추출물을 처리한 실험군 모두에서 세포 모양이 음성대조군 (도 2의 A 및 C)과 유사하게 관찰되어, 포도씨 추출물이 뇌허혈시 신경세포 보호효과가 탁월한 것을 확인할 수 있었다.

또한 허혈-재관류실시 후 포도씨 추출물의 적용여부 및 적용방법에 따른 신경세포의 사멸정도를 신경세포 계수로 확인한 결과 표 5에 나타내었다.

표 5는 정상군(Normal), 대조군(Control), 허혈-재관류 실시이전 포도씨 추출물 처리한 실험군(pre-male, pre-female) 및 허혈-재관류 실시후 포도씨 추출물 처리한 실험군(post-male, post-female)에서 측정된 신경세포수를 음성대조군에서의 계수한 신경세포 수로 나누어 백분율로 표시한 것이다. 별표는 99 % 신뢰수준에서 효능이 있는 것을 나타낸 것이다.

표 5에서, 대조군에서는 정상군에 비하여 약 11.6 % 정도의 생존율이 관찰되었다. 포도씨 추출물을 투여한 실험군에서는 대조군에 비하여 높은 신경세포 생존율이 관찰되었다. 또한 실험군에서 뇌허혈 유발 전에 포도씨 추출물을 투여한 실험군 신경세포 생존율은 수컷과 암컷에서 59.6 %, 57.4 %이며, 뇌허혈 유발 후에 포도씨 추출물을 투여한 실험군의 신경세포 생존율은 수컷과 암컷에서 51.9 %, 71.9 %인 것으로 확인되었다.

상기한 결과는 세포생존률의 비교약물인 에브셀렌(Ebselen)에 의한 세포 생존률 50-60 %인 것을 고려하여 보면, 포도씨 추출물의 신경세포 보호효과가 천연물임에 불구하고 매우 우수함을 입증하는 것이다.

따라서 시험관내 실험 및 생체내 실험을 통하여 포도씨 추출물이 뇌허혈 발생에 따른 신경세포사를 매우 효과적으로 보호함을 알 수 있었으며, 포도씨 추출물의 지적인 적용으로 뇌졸중 등의 뇌질환을 효과적으로 예방할 수 있을 것으로 생각된다.

첨예 3. 급성독성 실험

경구투여

ICR계 마우스와 스프라그 도울리 뱃트름 각각 10마리씩 4군으로 나누어 본 발명의 포도씨 추출물을 각각 100, 250, 500 및 1000 mg/kg의 용량으로 경구 투여한 후 주간 독성여부를 관찰한 결과 4군 모두에서 사망한 예가 한 마리도 없었고 외견상 조건과 별다른 증상을 찾아볼 수 없었다.

복강투여

ICR계 마우스(몸무게 25 ± 5 g)와 스프라그 도울리 뱃트름 각각 10마리씩 4군으로 나누어 본 발명의 포도씨 추출물을 각각 25, 50, 100 및 200mg/kg의 용량으로 강투여한 후 24시간 동안 독성여부를 관찰한 결과 4군 모두에서 사망한 예가 한 마리도 없었고 외견상 대조군과 별다른 증상을 찾아볼 수 없었다.

실험 결과, 본 발명의 포도씨 추출물은 급성독성이 거의 없음이 확인되었다.

본 발명의 포도씨 추출물은 아래와 같은 제형으로 투여할 수 있으며, 아래의 제에는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 이에 의해 본 발명의 내용이 제한되는 것은 아니다.

제예. 뇌허혈성 신경세포 손상 방지용 조성물의 제조예

수사제 제조

실시에 1의 포도씨 추출물 100 mg, 소디움 메타비설파이트 3.0 mg 및 메틸파라
0.8 mg, 프로필파라펜 0.1 mg을 주사용 멸균증류수에 혼합하여 최종 부피 2 ml의
주사제를 제조한 후 앰플하여 멸균한다.

경제 제조

실시에 1의 포도씨 추출물 200 mg, 유당 100 mg, 전분 100 mg 및 스테아린산
그네슘 600 mg을 혼합하고 타정하여 경제를 제조한다.

캡슐제 제조

실시에 1의 포도씨 추출물 100 mg, 유당 50 mg, 전분 50 mg, 말크 2 mg 및 스테
린산 마그네슘 600 mg을 혼합하고, 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

액제 제조

실시에 1의 포도씨 추출물 1000 mg, 설탕 20 g, 이성화당 20 g 및 적량의 레몬
을 경제수에 가하여 총 100 ml을 제조하고, 갈색병에 충전하고 멸균시켜 액제를 제
한다.

건강 식품의 제조

실시에 1의 포도씨 건조추출물 1000 mg, 비타민 혼합물 적량(비타민 A 아세테이
70 µg, 비타민 E 1.0 mg, 비타민 B1 0.13 mg, 비타민 B2 0.15 mg, 비타민 B6 0.5
mg, 비타민 B12 0.2 µg, 비타민 C 10 mg, 비오틴 10 µg, 니코틴산아미드 1.7 mg, 엽
산 50 µg, 판토텐산 칼슘 0.5 mg), 무기질 혼합물 적량(황산제1철 1.75 mg, 산화아연
.82 mg, 탄산마그네슘 25.3 mg, 제1인산칼륨 15 mg, 제2인산칼슘 55 mg, 구연산칼

90 mg, 탄산칼슘 100 mg, 염화마그네슘 24.8 mg)를 혼합하고, 기타 식염첨가제를
가하여 건강식염을 제조한다.

상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식염에 적합한 성분을
포함한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하
. 통상의 건강식염 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고,
상의 방법에 따라 건강식염 조성물 제조에 사용할 수 있다.

건강 음료의 제조

실시에 1의 포도씨 건조추출물 1000 mg, 구연산 1000 mg, 올리고당 100 g, 매실
추액 2 g, 타우린 1 g, 경제수를 가하여 전체 900 ml를 만들어 통상의 건강음료 제
방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85℃에서 교반 가열한 후,
들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 리터 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관
다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성
였지만, 수요계층, 수요국가, 사용 용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배
비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

발명의 효과

이상 살펴본 바와 같이, 본 발명은 포도씨 추출물은 뇌허혈시 발생하는 신경세
사를 저해하는 효과가 탁월할 뿐만 아니라 인체에 무해하여 신경세포의 괴사에 의
발생되는 뇌질환을 예방 및 치료하기 위한 용도로 사용가능하다.

특허청구범위]

청구항 1]

- (a) 건조하여 파쇄한 포도씨 무게 (kg)의 약 1 내지 20배의 부피의 물을 가한
 , 20 내지 50℃에서 약 1시간 내지 3일 교반하면서, 수산화나트륨 또는 수산화칼륨
 같은 강염기를 가하여 pH를 8 내지 11 로 조정하여 약 1시간 내지 24시간 교반수
 하는 제 1 단계;
- (b) 상기 추출액에 염산과 같은 강산을 가하여 pH 2 내지 4의 범위로 조정한
 , 원심분리하여 침전물만을 회수하는 제 2 단계;
- (c) 상기 침전물에 중탕비 약 3 내지 약 7배량의 에탄올, 메탄올 등과 같은 저
 알콜을 가하여 현탁시키고, 원심분리한 상등액을 감압농축시키는 제 3 단계;
- (d) 상기 농축액에 등량의 헥산과 같은 유기용매를 가하여 진탕한 후, 상등액인
 4산을 제거하고 남은 액을 경제, 등결건조하는 제 4 단계로 이루어진 제조 공정을
 함하는 제조방법으로부터 수득되는 신경세포 보호활성을 갖는 포도씨 추출물.

청구항 2]

- 신경세포 보호활성을 갖는 포도씨 추출물을 유효성분으로 포함하는 뇌질환 예방
 치료용 조성물.

3구항 3)

제 2항에 있어서, 상기 추출물은 꿀, 탄소수 1 내지 4의 저급알콜 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택되는 용매에 가용한 추출물인 조성물.

3구항 4)

제 3항에 있어서, 상기 추출물은 제 1항의 추출물인 조성물.

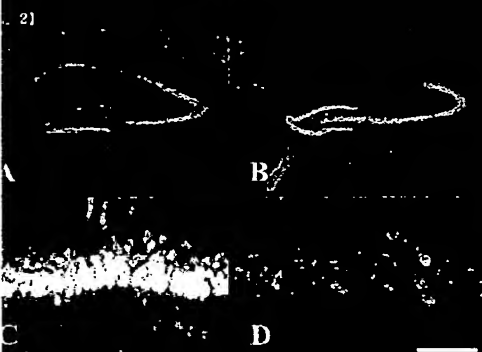
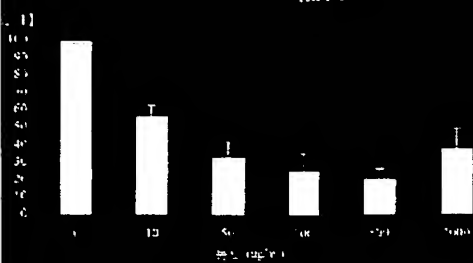
3구항 5)

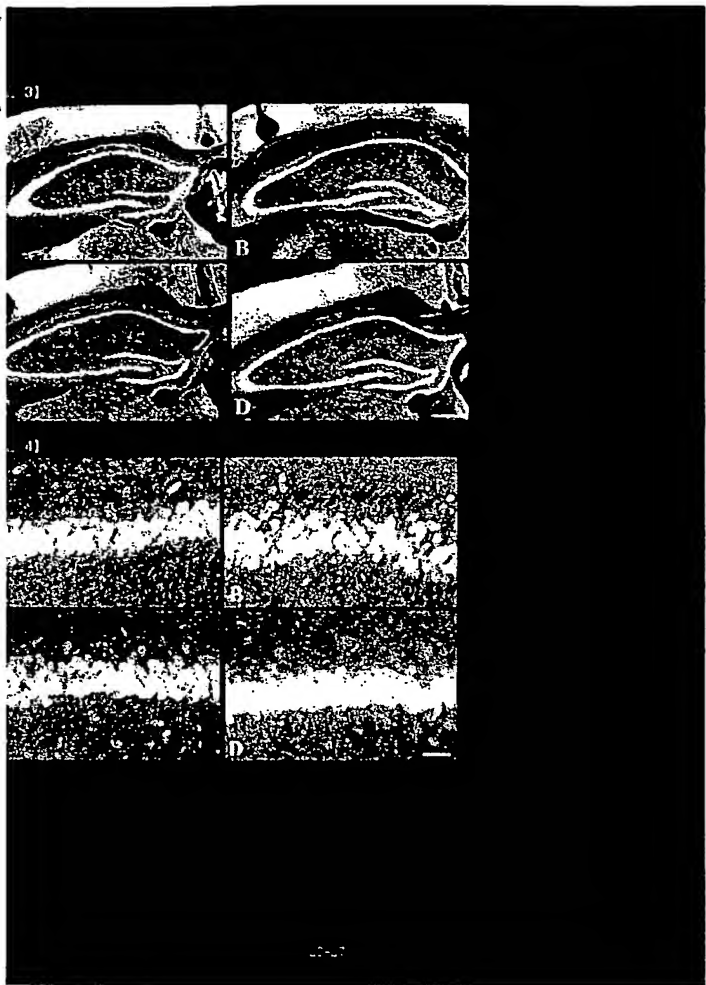
제 2항에 있어서, 상기 뇌질환은 뇌졸중, 중풍, 파킨슨병, 헌팅턴병, 피크(ick)병 또는 크로이츠펬트-야콥(Creutzfeld-Jakob)병인 것인 조성물.

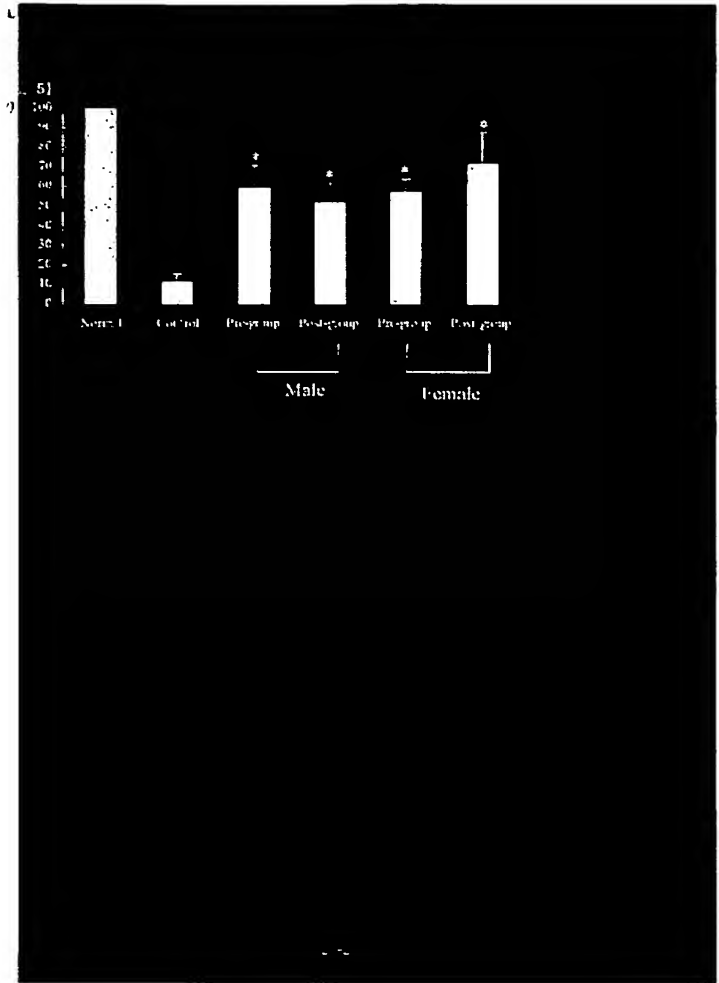
3구항 6)

신경세포 보호활성을 갖는 포도씨 추출물 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보 첨가제를 포함하는 건강기능식품.

(5.9)







Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR04/002793

International filing date: 02 November 2004 (02.11.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2003-0078503
Filing date: 07 November 2003 (07.11.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 12 November 2004 (12.11.2004)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.